

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI ALFA MANGOSTIN KULIT
BUAH MANGGIS (*Garcinia mangostana* L.) TERHADAP
Staphylococcus aureus DAN *Pseudomonas aeruginosa*
MULTIRESISTEN ANTIBIOTIK**

SKRIPSI



Oleh :

**GECA TIARA ODIANTI
K 100 060 015**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
SURAKARTA
2010**

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Penyakit infeksi sebenarnya sudah dikenal sejak zaman dahulu (Sujudi, 1994). Penyakit infeksi adalah penyakit yang ditularkan dari satu orang ke orang lain atau dari hewan ke manusia yang disebabkan oleh mikroorganisme seperti bakteri, virus, riketsia, jamur, dan protozoa (Gibson, 1996). Beberapa bakteri yang dapat menyebabkan infeksi diantaranya adalah *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

Staphylococcus dapat menimbulkan penyakit pada hampir semua organ dan jaringan. Dalam keadaan normal *S. aureus* terdapat di dalam saluran pernafasan atas, kulit, saluran cerna, dan vagina. Infeksi yang paling sering disebabkan oleh *S. aureus* adalah infeksi kulit (Shulman *et al.*, 1994). *S. aureus* menimbulkan penyakit jika daya tahan tubuh hospes turun dan biasanya diikuti dengan peradangan, nekrosis, dan pembentukan abses (Warsa, 1994). Infeksi *Staphylococcus aureus* dapat ditularkan dari satu orang ke orang lain melalui selaput mukosa yang bertemu dengan kulit (Jawetz *et al.*, 2005).

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri yang bersifat invasif, toksigenik, dan sering terdapat dalam flora usus normal pada kulit manusia serta merupakan patogen utama dari kelompoknya (Jawetz *et al.*, 1991). Infeksi yang disebabkan oleh

P. aeruginosa terjadi jika fungsi pertahanan inang abnormal dan merupakan penyebab infeksi nosokomial (Suryono, 1995).

Resistensi bakteri terhadap obat-obatan merupakan salah satu proses alamiah yang dilakukan oleh organisme untuk mengembangkan toleransi terhadap keadaan lingkungan yang baru (Pelczar dan Chan, 1988). Selain itu cara pengobatan dengan menggunakan kombinasi berbagai antibiotik juga dapat menimbulkan masalah resistensi yaitu munculnya bakteri yang multiresisten terhadap antibiotik. Multiresistensi suatu bakteri terhadap suatu antibiotik menimbulkan komplikasi pengobatan penyakit menjadi semakin sulit (Tjay dan Rahardja, 2002).

Akhir-akhir ini masyarakat mempunyai kecenderungan untuk memanfaatkan bahan alam dalam penanganan masalah penyakit yang dideritanya. Penggunaan obat tradisional dinilai memiliki efek samping yang lebih kecil dibandingkan dengan obat yang berasal dari bahan kimia (Tampubolon, 1981). Salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat adalah buah manggis (*Garcinia mangostana* L.). Kandungan kimia kulit manggis adalah xanton, mangostin, garsinon, flavonoid, dan tanin (Heyne, 1987; Soedibyo, 1998), gartanin, gamma mangostin, garsinon E, epikatelina (Chairungsrilerd *et al.*, 1996 *cit* Chaverri *et al.*, 2008). Metabolit sekunder utama dari *Garcinia mangostana* adalah xanton. Salah satu derivat xanton adalah alfa mangostin (Jung *et al.*, 2006; Harrison, 2002; Suksamrarn *et al.*, 2002). Alfa mangostin merupakan senyawa aktif dari manggis yang berasal dari kulit buah manggis. Menurut hasil penelitian dilaporkan bahwa alfa mangostin dari kulit buah manggis mempunyai aktivitas antijamur, antioksidan, antiviral, dan antibakteri

(Sundaram *et al.*, 1983 *cit* Chaverri *et al.*, 2008). Nama IUPAC dari alfa mangostin adalah (1,3,6-trihidroksi-7-metoksi-2,8-bis (3metil-2-butenil)-9H-xanten-9-on) (Sudarsono dkk., 2002).

Pada penelitian sebelumnya alfa mangostin dapat menghambat pertumbuhan bakteri yaitu *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. thypimurium*, *B. subtilis* dan dilaporkan bahwa konsentrasi hambat minimum (MIC, konsentrasi terkecil dari suatu antimikroba dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme setelah diinkubasi) dari alfa mangostin antara 12,5 dan 50 µg/mL (Sundaram *et al.*, 1983 *cit* Chaverri *et al.*, 2008). Aktivitas antibakteri dari alfa mangostin telah diteliti oleh Linuma *et al.* (1996) dalam 49 spesies dari bakteri *S. aureus* yang resisten terhadap metisilin (MRSA) dengan MIC 1,57-12,5 µg/mL. Berdasarkan penelitian sebelumnya, maka perlu dilakukan pengujian aktivitas antibakteri alfa mangostin terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* multiresisten antibiotik serta daya bunuh dari alfa mangostin terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* multiresisten antibiotik.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas dapat dirumuskan permasalahan : apakah alfa mangostin pada kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* multiresisten antibiotik.

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini untuk : menentukan aktivitas antibakteri alfa mangostin pada kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* multiresisten antibiotik.

D. Tinjauan Pustaka

1. Tanaman manggis

a. Klasifikasi tumbuhan manggis

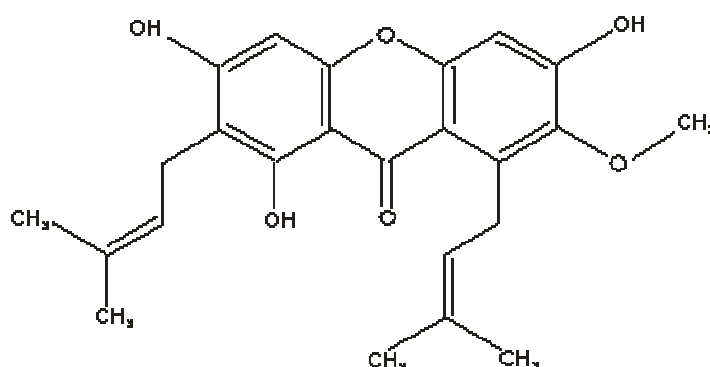
Sistematika tumbuhan manggis diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Guttiferanales
Famili	: Guttiferae
Genus	: <i>Garcinia</i>
Spesies	: <i>Garcinia mangostana</i> L. (Rukmana, 1995)

b. Kandungan kimia

Kandungan kimia kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) adalah xanton, mangostin, garsinon, flavonoid dan tanin (Heyne, 1987; Soedibyo, 1998), gartanin, gamma mangostin, garsinon E, epikatelin (Chairungsrilerd *et al.*, 1996 *cit* Chaverri *et al.*, 2008). Metabolit sekunder utama dari *G. mangostana* adalah xanton.

Xanton merupakan derivat dari campuran polifenol yang mempunyai aktivitas biologis yang signifikan dalam sistem *in vitro* (Linuma *et al.*, 1996). Sebagian besar xanton ditemukan pada tumbuhan tinggi yang dapat diisolasi dari empat suku, yaitu *Guttiferae*, *Moraceae*, *Polygalaceae* dan *Gentianaceae* (Sluis, 1985). Unsur utama dari xanton adalah alfa mangostin dan gama mangostin (Jung *et al.*, 2006; Harrison, 2002; Suksamrarn *et al.*, 2002). Pada kulit buah manggis mengandung senyawa yang meliputi mangostin, mangostenol, mangostinon A, mangostenon B, trapezifolixanton, tovofillin B, alfa mangostin, beta mangostin, garsinon B, mangostanol, flavonoid epikatekin (Suksamrarn *et al.*, 2002). Struktur senyawa alfa mangostin dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur Kimia Alfa Mangostin

Alfa mangostin merupakan metabolit baru dari 1,3,6,7-tetrahidroksi-2,8-di(3-metil-2-butenil) xanton yang ditemukan pada kulit buah *Garcinia mangostana* dan

mempunyai nama IUPAC (1,3,6-trihidroksi-7-metoksi-2,8-bis(3metil-2-butenil)-9H-xanten-9-on) (Sudarsono, 2002).

Ditemukan 2 senyawa alkaloid dalam ekstrak kulit buah manggis yang larut dalam petroleum eter. Kulit kayu, kulit buah, dan lateks kering *Garcinia mangostana* mengandung sejumlah zat warna kuning yang berasal dari dua metabolit yaitu mangostin dan beta mangostin yang berhasil diisolasi. Mangostin merupakan komponen utama sedangkan beta mangostin merupakan konstituen minor (Sudarsono, 2002). Kulit kayu dari tanaman manggis diperoleh tanin (Abbiw, 1990). Kulit buah manggis mengandung 7-13 % tanin (Burkill, 1994).

Lebih dari 60 senyawa xanton diisolasi dari bagian tanaman manggis yang berbeda, antara lain β -mangostin, 1-isomangostin, 3-isomangostin, 9-hidroksikalabaxanton, 8-deoksigartanin, dimetilkalbaxanton, garcinon B, gargarcinon D, garcinon E, gartanin, mangostanol, mangostanin, dan mangostinon (Ji *et al.*, 2007; Walker, 2007).

c. Khasiat manggis

Dalam bidang kesehatan kulit buah digunakan untuk mengobati sariawan, disentri, nyeri urat, sembelit. Buah yang mengandung resin digunakan untuk mengobati disentri dan diare. Kulit batang digunakan untuk mengatasi nyeri perut. Akar untuk mengatasi haid yang tidak teratur. Menurut hasil penelitian kulit buah manggis memiliki aktivitas antibakteri, antioksidan dan antimetastasis pada kanker usus (Tambunan, 1998). Alfa mangostin yang terkandung dalam kulit manggis

menunjukkan aksi antibakteri dengan MIC 12,5 dan 50 $\mu\text{g/mL}$ (Sundaram *et al.*, 1983 *cit* Chaverri *et al.*, 2008).

2. Bakteri

Bakteri adalah mikroorganisme bersel satu, berkembang biak dengan pembelahan diri yang hanya dapat dilihat dengan mikroskop (Jawetz *et al.*, 1991). Bakteri termasuk dalam golongan prokariot (Assani, 1994). Bakteri mempunyai diameter 0,2-5 μm , asam nukleat berupa DNA dan RNA dan ribosom 70S, bereplikasi secara pembelahan biner dan hidup pada sel tuan rumah untuk pertumbuhannya (Levinson, 2004). Bakteri dibagi dalam golongan Gram positif dan Gram negatif berdasar reaksinya terhadap prosedur pewarnaan Gram. Bakteri Gram positif akan tetap berwarna biru karena tetap mengikat senyawa kristal violet-iodin dan bakteri Gram negatif warnanya akan hilang oleh alkohol (Jawetz *et al.*, 2005)

Kebanyakan dinding sel Gram positif mengandung cukup banyak asam teikoat dan asam teikuronat. Namun selain itu, beberapa dinding sel Gram positif juga mengandung molekul polisakarida. Polisakarida berasal dari proses hidrolisis dinding sel Gram positif. Dinding sel Gram negatif mengandung tiga komponen yang terletak di luar lapisan peptidoglikan yaitu lipoprotein, membran luar, dan lipopolisakarida. Lipopolisakarida dinding sel Gram negatif terdiri dari suatu lipid yang kompleks, yang dinamakan lipid A. Lipid A terdiri dari suatu rantai satuan disakarida

glukosamin yang dihubungkan dengan ikatan pirofosfat, tempat melekat sejumlah asam-asam lemak berantai panjang (Jawetz *et al.*, 1991).

a. *Staphylococcus aureus*

Sistematika dari *Staphylococcus aureus* adalah sebagai berikut :

Divisi	: Protophyta
Kelas	: Schizomycetes
Bangsa	: Eubacteriales
Suku	: Micrococcaceae
Marga	: Staphylococcus
Jenis	: <i>Staphylococcus aureus</i> (Salle, 1961)

Kata *Staphyle* berasal dari bahasa Yunani yang berarti setangkai buah anggur, menyerupai susunan yang bergerombol dari kokus tersebut. Susunan yang bergerombol biasanya pada sediaan yang dibuat dari media padat, sedangkan sediaan dari media cair biasanya tersebar atau berderet seperti rantai pendek (Salle, 1961).

Staphylococcus adalah sel Gram-positif berbentuk bulat, biasanya tersusun dalam rangkaian tak beraturan seperti anggur. *Staphylococcus* adalah sel-sel berbentuk bola dengan garis tengah sekitar 1 μm dan tersusun dalam kelompok-kelompok tak beraturan. *Staphylococcus* tidak bergerak dan tidak membentuk spora (Jawetz *et al.*, 2005). *Staphylococcus* bersifat patogen, nonmotil, dan memproduksi katalase (Levinson, 2004).

Staphylococcus mudah tumbuh pada kebanyakan perbenihan bakteri dalam keadaan aerobik atau mikroaerofilik. Bakteri ini tumbuh paling cepat pada suhu 37°C, tetapi membentuk pigmen paling baik pada suhu kamar (20-25°C). Koloni pada perbenihan padat berbentuk bundar, halus, menonjol, dan berkilau. *S. aureus* membentuk koloni berwarna abu-abu sampai kuning emas tua (Jawetz *et al.*, 1991).

Staphylococcus menghasilkan katalase, yang membedakan dengan streptokokus. Katalase yang mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Bakteri ini meragikan banyak karbohidrat dengan lambat, menghasilkan asam laktat, tetapi tidak menghasilkan gas (Jawetz *et al.*, 1991). *Staphylococcus* mempunyai ciri peradangan setempat, nekrosis dan pembentukan abses. Pada penyebaran ke bagian tubuh lain melewati pembuluh getah bening dan pembuluh darah (Warsa, 1994). *Staphylococcus* menyebabkan penyakit bisul, berbagai infeksi *pyogenik*, keracunan makanan, dan *toxic shock syndrome* (Levinson, 2004).

b. *Pseudomonas aeruginosa*

Sistematika dari *Pseudomonas aeruginosa* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Prokaryota
Division	: Schizomycetae
Class	: Schizomycetae
Ordo	: Pseudomonadales
Familia	: Pseudomonadaceae

Genus : *Pseudomonas*

Species : *Pseudomonas aeruginosa* (Salle, 1961).

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri Gram negatif, berbentuk batang, bergerak, dan tumbuh baik pada suhu 37-42°C. *Pseudomonas* ditemukan secara luas di tanah, air, tumbuhan, dan hewan. *P. aeruginosa* bergerak dan berbentuk batang, berukuran sekitar 0,6 x 2 µm. *P. aeruginosa* adalah aerob obligat yang tumbuh dengan mudah pada banyak jenis perbenihan biakan, kadang-kadang menghasilkan bau yang manis atau menyerupai anggur. *P. aeruginosa* membentuk koloni halus bulat dengan warna fluoresensi kehijauan. Bakteri ini sering menghasilkan piosianin, pigmen kebiru-biruan yang tak berfluoresensi, yang berdifusi ke dalam agar (Jawetz *et al.*, 1991).

Pseudomonas aeruginosa bersifat oksidase positif dan tidak meragikan karbohidrat. Tetapi banyak strain yang mengoksidasi glukosa. *P. aeruginosa* hanya bersifat patogen bila masuk ke daerah yang fungsi pertahanannya abnormal, misalnya bila selaput mukosa dari kulit robek karena kerusakan jaringan langsung. *Pseudomonas aeruginosa* menimbulkan infeksi pada luka dan luka bakar, menimbulkan nanah hijau kebiruan, meningitis, bila masuk bersama punksi lumbal dan infeksi saluran kemih. *P. aeruginosa* dapat menyerang aliran darah dan

mengakibatkan sepsis yang fatal, ini biasanya terjadi pada penderita leukemia atau limfoma (Jawetz *et al.*, 1991).

3. Antibakteri

Antibakteri adalah salah satu senyawa yang dihasilkan oleh suatu mikroorganisme dan dalam konsentrasi kecil mampu menghambat serta membunuh proses kehidupan suatu mikroorganisme (Jawetz *et al.*, 2005). Berdasarkan sifat toksisitas selektif, bakteri bersifat menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik) dan bersifat membunuh bakteri (bakterisida). Kadar minimum yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri atau membunuhnya, masing-masing dikenal dengan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) (Setiabudy dan Gan, 1995). Pemusnahan bakteri dengan antibakteri yang bersifat bakteriostatik masih tergantung dari kesanggupan reaksi daya tahan tubuh hospes. Berdasarkan mekanisme kerjanya, antibakteri dibagi dalam lima kelompok antara lain:

a. Antibakteri yang menghambat metabolisme sel mikroba

Bakteri membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya. Berbeda dengan mamalia yang mendapatkan asam folat dari luar, kuman patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari asam amino benzoat (PABA) untuk kebutuhan hidupnya. Apabila antibakteri bersaing dengan PABA untuk diikutsertakan dalam

pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat yang nonfungsional. Akibatnya, kehidupan mikroba akan terganggu (Setiabudy dan Gan, 2007).

b. Antibakteri yang menghambat sintesis dinding sel bakteri

Bakteri memiliki lapisan luar yang kaku. Lapisan yang kaku tersebut adalah dinding sel yang dapat mempertahankan bentuk bakteri dan melindungi membran protoplasma di bawahnya (Jawetz *et al.*, 2001). Dinding sel bakteri terdiri dari polipeptidoglikan yaitu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Penghambatan reaksi dalam proses sintesis dinding sel dapat menyebabkan tekanan osmotik dalam sel bakteri lebih tinggi daripada di luar sel maka perusakan dinding sel bakteri akan menyebabkan lisis yang merupakan dasar efek bakterisidal pada kuman yang peka (Setiabudy dan Gan, 2007).

c. Antibakteri yang mengganggu keutuhan membran sel bakteri

Kerusakan pada membran sel bakteri dapat mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau terjadi kematian sel (Pelczar dan Chan, 1998). Polimiksin merupakan suatu senyawa amonium-kuarternier yang bereaksi dengan fosfat pada fosfolipid membran sel bakteri dapat merusak membran sel. Kerusakan membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel mikroba yaitu protein, asam nukleat, nukleotida, dan lain-lain (Setiabudy dan Gan, 2007).

d. Antibakteri yang menghambat sintesis protein sel bakteri

Dalam kelangsungan hidupnya, sel bakteri mensintesis berbagai protein. Sintesis protein terjadi di ribosom yang dibantu oleh mRNA dan tRNA. Pada bakteri,

ribosom terdiri dari dua sub unit yang didasarkan pada konstanta sedimentasi yaitu ribosom 30S dan 50S. Agar kedua ribosom tersebut dapat berfungsi pada proses sintesis protein, maka keduanya akan bersatu pada pangkal rantai mRNA menjadi ribosom 70S. Tetrasiklin merupakan salah satu antibiotik yang dapat menghambat sintesis protein dengan cara berikatan dengan ribosom 30S dan menghalangi masuknya kompleks tRNA-asam amino pada lokasi asam amino (Setiabudy dan Gan, 2007).

e. Antibakteri yang menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri

Molekul DNA dan RNA memegang peranan penting dalam proses kehidupan sel secara normal. Hal ini berarti bahwa semua gangguan yang terjadi pada pembentukan dan fungsi zat-zat tersebut dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel dan berakibat kematian sel (Pelczar dan Chan, 1998).

Rifampisin merupakan salah satu antibiotik yang dapat menghambat sintesis asam nukleat dengan cara berikatan dengan enzim polimerase-RNA sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut (Setiabudy dan Gan, 2007).

4. Resistensi antibiotik

Resistensi terhadap obat antimikroba secara garis besar dapat melalui 3 mekanisme antara lain :

a. Obat tidak dapat mencapai tempat kerjanya di dalam sel mikroba. Pada bakteri Gram-negatif, molekul antibakteri yang kecil dan polar dapat menembus dinding luar

dan masuk ke dalam sel melalui lubang-lubang kecil yang disebut dengan porin. Jika porin mengalami mutasi maka masuknya antibakteri ke dalam sel akan terhambat (Setiabudy dan Gan, 2007).

b. Mekanisme inaktivasi obat sering terjadi resistensi terhadap golongan aminoglikosida dan beta laktam karena bakteri membuat enzim yang merusak kedua golongan antibakteri tersebut (Setiabudy dan Gan, 2007).

c. Bakteri mengubah tempat ikatan. Contohnya pada bakteri *S. aureus* yang resisten terhadap metisilin (MRSA). Bakteri ini mengubah *Penicillin Binding Protein* (PBP) sehingga afinitasnya menurun terhadap metisilin dan antibiotik beta laktam lain (Setiabudy dan Gan, 2007).

5. Uji aktivitas antibakteri

Uji aktivitas antibakteri mempunyai tujuan mengukur aktivitas daya antibakteri dari suatu senyawa kimia terhadap bakteri, menentukan konsentrasi suatu antibakteri terhadap cairan badan atau jaringan, dan kepekaan suatu antibiotik terhadap konsentrasi-konsentrasi obat yang dikenal (Jawetz *et al.*, 2001). Uji aktivitas antibakteri untuk menentukan kepekaan suatu bakteri patogen dapat dilakukan dengan dua metode antara lain :

a. Metode dilusi

Metode ini menggunakan antibakteri dengan kadar yang menurun secara bertahap, baik dengan media cair atau agar. Kemudian media diinokulasi bakteri uji dan dieramkan. Antibakteri dilarutkan dengan kadar yang dapat menghambat atau

mematikan bakteri pada tahap akhir. Uji kepekaan cara dilusi agar memakan waktu dan penggunaannya dibatasi pada keadaan tertentu saja. Uji kepekaan cara dilusi cair menggunakan tabung reaksi ataupun *microdilution plate*. Keuntungan uji mikrodilusi cair adalah bahwa uji ini memberi hasil kuantitatif yang menunjukkan jumlah antibakteri yang dibutuhkan untuk mematikan bakteri (Jawetz *et al.*, 2005). Pada Metode dilusi cair, masing-masing konsentrasi obat ditambahkan suspensi bakteri dalam media dan pada metode dilusi padat tiap konsentrasi obat dicampur dengan media agar, lalu ditanami bakteri. Metode dilusi cair adalah metode untuk menentukan konsentrasi minimal dari suatu antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri yang ditunjukkan dengan ketidaksamaan adanya kekeruhan disebut Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) (Anonim, 2004).

b. Metode difusi

Metode yang paling sering digunakan adalah metode difusi agar. Metode ini dipengaruhi oleh beberapa faktor fisik dan kimia, selain faktor antara obat dan organisme (misalnya sifat medium dan kemampuan difusi, ukuran molekular dan stabilitas obat). Meskipun demikian, standarisasi faktor-faktor tersebut memungkinkan melakukan uji kepekaan dengan baik (Jawetz *et al.*, 2005). Pada metode difusi ini ada beberapa cara yang dapat digunakan, yaitu:

1). Cara Kirby Bauer

Beberapa koloni bakteri yang telah mengalami pertumbuhan selama 24 jam diambil untuk disuspensikan ke dalam 0,5 mL BHI cair, kemudian diinkubasi pada

37°C selama 5-8 jam. Suspensi bakteri yang telah ditambahkan akuades steril hingga konsentrasi 10^8 CFU per mL dioleskan pada media agar hingga rata, kemudian kertas samir (*disk*) yang mengandung antibakteri diletakkan di atasnya, diinkubasi pada 37°C selama 18-24 jam (Anonim, 1993). Hasilnya dibaca :

a). Zona radikal yaitu daerah yang menunjukkan tidak terjadinya pertumbuhan bakteri di sekitar kertas samir (*disk*). Potensial antibakteri diukur dengan menggunakan diameter dari zona radikal.

b). Zona irradikal yaitu daerah di sekitar kertas samir (*disk*) yang menunjukkan bahwa pertumbuhan bakteri dihambat oleh bakteri, tetapi tidak dimatikan (Anonim, 1993).

2). Cara Sumuran

Beberapa koloni bakteri yang telah mengalami pertumbuhan selama 24 jam diambil untuk disuspensikan ke dalam 0,5 mL BHI cair, kemudian diinkubasi pada 37°C selama 5-8 jam. Suspensi bakteri yang telah ditambahkan akuades steril hingga konsentrasi 10^8 CFU/mL dioleskan pada media agar hingga rata. Media agar dibuat sumuran ditetaskan larutan antibakteri, diinkubasi pada 37°C selama 18-24 jam. Hasilnya dibaca seperti cara Kirby Bauer (Anonim, 1993).

3). Cara *Pour Plate*

Beberapa koloni bakteri yang telah mengalami pertumbuhan selama 24 jam diambil untuk disuspensikan ke dalam 0,5 mL BHI cair, kemudian diinkubasi pada

37°C selama 5-8 jam. Suspensi bakteri yang telah ditambahkan akuades steril hingga konsentrasi 10^8 CFU/mL. Suspensi bakteri diambil satu mata ose dan dimasukkan ke dalam 4 mL agar base 1,5% yang mempunyai suhu 50°C. Setelah suspensi bakteri tersebut homogen, dituang pada media agar Mueller Hinton, ditunggu sampai agar tersebut membeku dan disk diletakkan di atas media dan dieramkan selama 15-20 jam dengan temperatur 37°C. Hasil dibaca sesuai standar masing-masing antibakteri (Anonim, 1993).

6. Media

Mikroorganisme yang teramati secara mikroskopik dan yang tumbuh dalam lingkungan alami dapat terbukti sangat sukar untuk tumbuh secara murni pada medium buatan (Jawetz *et al.*, 2005). Media adalah suatu bahan yang terdiri dari campuran zat makanan yang diperlukan untuk menumbuhkan suatu mikroorganisme, dalam rangka isolasi, memperbanyak perhitungan dan pengujian sifat fisiologik suatu mikroorganisme (Anonim, 2007). Medium pertumbuhan yang baik harus mengandung seluruh nutrien yang dibutuhkan oleh organisme untuk perkembangbiakannya, dan sejumlah faktor seperti pH serta temperatur harus benar-benar dikontrol (Jawetz *et al.*, 2005). Nutrien yang diperlukan adalah hidrogen, sumber karbon, sumber nitrogen, mineral, faktor pertumbuhan seperti asam amino, purin, pirimidin, dan vitamin (Jawetz *et al.*, 2005). Syarat-syarat media untuk mendapatkan suatu lingkungan kehidupan yang cocok bagi pertumbuhan bakteri adalah susunan makanan, tekanan osmose, derajat keasaman, temperatur, dan sterilitas (Anonim, 2007).

7. Ekstraksi

Ekstraksi adalah sediaan kering, kental atau cair dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang cocok, di luar pengaruh cahaya matahari langsung (Departemen kesehatan, 1979). Metode ekstraksi dipilih berdasarkan beberapa faktor seperti sifat bahan mentah obat atau simplisia dan daya penyesuaian dengan tiap macam metode ekstraksi dan kepentingan dalam memperoleh ekstrak yang sempurna atau mendekati sempurna dari obat atau simplisia (Ansel, 1989). Selain itu metode ekstraksi dipilih berdasarkan sumber bahan alami dan senyawa yang akan diisolasi (Sarker *et al.*, 2006). Senyawa khas (zat aktif) akan didapatkan dengan menggunakan metode maserasi yang cepat dan teliti (Harborne, 1987).

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi. Maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari tersebut akan menembus dinding sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam dan di luar sel, maka larutan terpekat akan didesak keluar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar dan di dalam sel (Ansel, 1989). Waktu maserasi pada umumnya 5 hari. Selama waktu tersebut, keseimbangan antara

bahan yang diekstraksi pada bagian dalam sel dengan yang masuk dalam cairan telah tercapai, sehingga penarikan zat yang disari oleh cairan penyari telah optimal. Dengan pengadukan, keseimbangan konsentrasi bahan lebih cepat dalam cairan. Secara teoritis pada suatu maserasi tidak memungkinkan terjadinya ekstraksi absolut (Voight, 1994).

8. Isolasi

Metode isolasi adalah proses pengambilan suatu komponen tertentu dalam keadaan murni dari suatu ekstrak. Kelarutan (hidrofobisitas atau hidrofilisitas), sifat asam basa, stabilitas, dan ukuran molekul merupakan gambaran umum molekul yang sangat membantu dalam menentukan proses isolasi. Jika mengisolasi suatu senyawa yang sudah diketahui atau dari sumber yang baru, dapat dicari informasi dari literatur mengenai sifat kromatografi senyawa target tersebut, sehingga mudah untuk menentukan metode isolasi yang sesuai. Tetapi akan lebih sulit untuk menentukan prosedur isolasi untuk ekstrak dengan kandungan senyawa yang sama sekali belum diketahui tipe senyawanya (Sarker *et al.*, 2006).